

《使用上又は取扱い上の注意》

1. 試薬に関する注意事項

- ・本品は研究用試薬です。疾病の治療・診断・予防を目的として使用しないで下さい。
- ・本品の構成試薬は異なる製造番号の製品、あるいは別製品の構成試薬と組み合わせて使用しないで下さい。
- ・使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。

2. 使用者の危険防止に関する注意事項

試薬類を飲んだりなめたりしないで下さい。試薬が皮膚に付着したり、目や口に入ったりしないようじゅうぶん注意して下さい。また、誤って皮膚に付着したり、目や口に入った場合は、直ちに水でじゅうぶんに洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師に相談して下さい。

3. 汚染の防止

PCRで増幅したDNAにより、次の検体や試薬が汚染されると誤ったタイピング結果を導く原因となります。そのため、以下のような汚染防止策を施して、PCR前の検体及び試薬の汚染防止にじゅうぶん注意して下さい。

＜作業の区分けによる汚染防止＞

- ・汚染を物理的に防止するために、PCRの反応前後でエリアを変えて操作を行って下さい。また、使用するピペットおよびチップはそれぞれのエリア専用とし、互いに持ち込まないようにして下さい。
- ・PCR後の操作はエリア専用の作業着を着用して行って下さい。使用した手袋は使い捨てとし、他の場所に持ち込まないで下さい。
- ・作業終了後は実験台等を0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液(家庭用の塩素系漂白剤を10倍に希釈したもの)で拭いて下さい。

＜汚染の除去＞

PCRで増幅したDNAによる汚染が疑われた場合には、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で拭いて下さい。

4. 廃棄物に関する注意事項

PCR反応液を扱ったチップ等は0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液の入った容器に捨て、そのまま密封して廃棄して下さい。検査終了後、使用したPCR用チューブや96ウェルPCRプレートは、オートクレーブしないでそのまま密封して廃棄して下さい。DNAはオートクレーブでは分解されません。エアロゾルを発生して汚染の原因になりますので、オートクレーブは行わないで下さい。

5. その他の注意

本製品は改良のため、予告なく仕様を変更することもありますのでご了承下さい。

《貯蔵方法》 《キットの構成》の項に記載

** 《有効期間》 18ヵ月(使用期限は外箱に記載)

《包装単位》 96テスト

《問い合わせ先》

湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部

〒739-1195 広島県安芸高田市甲田町下甲立1624

TEL (0826) 45-4625

FAX (0826) 45-4624

URL: <http://www.wakunagahla.jp/>

受付時間 9:00～12:00、13:00～17:30(月～金曜日、但し祝日を除く)

製造販売元

湧永製薬株式会社

広島県安芸高田市甲田町下甲立1624

<http://www.wakunaga.co.jp/>

この説明文書をよく読んでから使用して下さい。
また必要な時に読めるように保管して下さい。

研究用試薬

WAKFlow HLA タイピング試薬 HLA-DRB1

WAKFlow HLA タイピング試薬はHLAの遺伝子型を決定するための研究用試薬です。本品はDNAタイピング法の1つであるPCR-SSOP(Sequence Specific Oligonucleotide Probe)法に基づき、フローサイトメトリーを応用したLuminex社(<http://www.luminexcorp.com/>)のxMAP®測定技術を用いてHLA遺伝子のタイピングを行うものです。

《測定原理》

本製品では、5'末端ビオチン標識プライマーを用いて目的の遺伝子領域をPCRで増幅させます。この増幅DNAを、蛍光で色分けしたビーズ上のプローブとハイブリダイズさせます。ビオチン標識された増幅DNAに蛍光標識ストレプトアビジン(SAPE)を結合させた後、ビーズ上の蛍光(SAPE)とビーズの種類を同時に検出・識別します。増幅DNAが結合したビーズ(プローブ)の種類を判定することで遺伝子型を決定します。

《キットの構成》(96テスト分)

本製品の構成試薬およびその貯蔵方法は、以下のとおりです。

-15℃以下に保存

- ①増幅試薬(DR専用).....1323 μL×2本
- ②DNAポリメラーゼ液(DR専用).....54 μL×1本

2～8℃に保存

- ③変性液.....1000 μL×1本
- ④ハイブリダイゼーション溶液.....2200 μL×1本
- ⑤ビーズミックス(DR専用).....330 μL×1本
- ⑥SAPE(蛍光ストレプトアビジン).....220 μL×1本
- ⑦洗浄液.....50 mL×1本
- ・プレートシール.....2枚

注1) 製品到着後、すぐに使用しない場合は、①増幅試薬、②DNAポリメラーゼ液は-15℃以下に保存して下さい。

注2) ⑤ビーズミックス、⑥SAPEは遮光して2～8℃に保存して下さい。

《必要な装置・器具》

本製品に必要な装置、器具および機材については、別冊の「WAKFlow HLA タイピング試薬 操作説明書」を参照して下さい。

《操作方法》

1. 検体(DNA)の調製

検体(DNA)の推奨濃度は 20 µg/mL です。DNA の抽出は、汚染防止のため PCR で増幅した DNA を扱うエリアとは別のエリアで行って下さい。

2. PCR

注)以下の操作は、汚染防止のため手袋を着用して行って下さい。

- 1) 以下の試薬を混合します。この操作は、氷上で行って下さい。

＜PCR ミックス＞

1 検体あたりの組成	
①増幅試薬(DR 専用)	24.5 µL
②DNA ポリメラーゼ液(DR 専用)	0.5 µL

- 2) 1) で混合した PCR ミックス:25 µL を添加した PCR 用チューブに、検体を 2 µL 加えます。

** 3) サーマルサイクラーにセットし、以下の条件で PCR を行います。

PCR の反応条件								
93°C	→	93°C	→	60°C	→	72°C	→	4°C
3 min		30 sec		30 sec		30 sec		Hold
			↑					
			40 サイクル					

- この条件は、「VeritiPro™ 96-Well サーマルサイクラー® 0.2 mL」、「Veriti™ 96-Well サーマルサイクラー® 0.2 mL」および「Gold-96well GeneAmp® PCR System 9700」を用いる場合の条件で、PCR はおよそ 1.5 時間で終了します。他の装置を用いる場合は、アニーリング条件、サイクル数などの変更が必要となることがあります。
- Veriti™ 96-Well サーマルサイクラー® 0.2 mL で行う場合は、初期画面より「Tools Menu」で「Convert a Method」を選択し、「9700 Mode」または「9700 Max Mode」から、PCR の反応条件の設定を行ってください。「Reaction Volume」は 27 µL に設定してください。
- VeritiPro™ 96-Well サーマルサイクラー® 0.2 mL で行う場合は、プログラム選択後、「Actions」内の「Simulation Mode」から「GeneAmp® PCR System 9700」を選択してください。
- PCR 終了後、すぐにハイブリダイゼーション以降の操作を行わない場合は、反応液を 4°C に保管して下さい。室温に放置されると、蛍光シグナルが低くなる場合があります。

3. ハイブリダイゼーションと検出

(1) 準備

- ・55°C hold に設定したサーマルサイクラーを用意します。
- ・Luminex を起動し、Luminex XYP を 37°C に設定しておきます。
 - Luminex を 4 時間以上放置するとレーザーが消え、ウォームアップに 30 分かかりますので注意して下さい。
- ・以下の操作は、96 ウェル PCR プレートを用いて行います。(96 ウェル PCR プレートを用いると検体数が多い場合でも迅速な処理が可能です。)

(2) ハイブリダイゼーションと検出の手順

注)以下の 1)~5)の操作は、汚染防止のため手袋を着用して行って下さい。

特に、③変性液はアルカリ性ですので、使用する際は手袋と保護眼鏡を着用し、試薬が皮膚・目・粘膜に触れないように注意して下さい。もし、このようなことが起きた場合は直ちに水でじゅうぶんに洗い流して下さい。また、こぼれた場合は水で希釈してから拭き取って下さい。

- * 1) ③変性液:5 µL を分注した 96 ウェル PCR プレートのウェルに、PCR 終了後のじゅうぶんに室温に戻した増幅 DNA:5 µL を加え、ボルテックスまたはピペッティング(4 回)でよく混合し、室温に 5~10 分間放置します。
- 2) 以下の試薬を混合します。

＜ハイブリミックス＞

1 検体あたりの組成	
④ハイブリダイゼーション溶液	20 µL
⑤ビーズミックス(DR 専用)	3 µL
⑥SAPE(蛍光ストレプトアビジン)	2 µL

- ⑤ビーズミックスは使用前にボルテックスなどでしっかりと攪拌して下さい。
- 3) 1) で変性した増幅 DNA に、2) で調製したハイブリミックス:25 µL を加え、シールをした後、ボルテックスでよく攪拌します。シールに付着した反応液は、スナッピングによりできるだけ反応容器内に落とします。
- 4) 55°C に設定したサーマルサイクラーに 3) のプレートをセットし、30 分間ハイブリダイゼーションを行います。
- 5) ⑦洗浄液:75 µL を各ウェルに加え、1 分間遠心分離を行います。遠心分離の後、上清をスナッピングにより除きます(溶液がほとんど残らないようにして下さい)。
 - プレート遠心分離機を用い、3,000rpm(約 1000×g)で 1 分間の遠心分離を行います。
 - 溶液が多く残った場合は、5) の操作をもう一度繰り返して下さい。
- 6) ⑧洗浄液:75 µL を各ウェルに加えます。
- * 7) Luminex XYP のブロック温度が 37°C であることを確認して、ビーズミックスの Lot 番号に対応したプロトコールファイルを使用して測定します。
 - 測定前に室温放置すると、非特異反応の原因となりますので、速やかに測定を開始して下さい。

** 《測定結果の判定法》

測定結果の CSV ファイルを「WAKFlow Typing Software」で開き、各蛍光ビーズの陽性・陰性を判定表に記載しているカットオフ値をもとに自動判定します。(自動判定では、蛍光強度がカットオフ値以上を示すビーズを陽性、カットオフ値以下を示すビーズを陰性とし、各ビーズの陽性・陰性のパターンから HLA 遺伝子のタイプを決定します。)

- ビーズミックスの Lot 番号に対応していないパターンファイルでは判定できませんので注意して下さい。
- 専用の判定ソフトウェア「WAKFlow Typing Software」は、試薬ご購入の際、無償にて提供いたします。

なお、判定に用いる HLA 遺伝子のアレルは、Anthony Nolan Research Institute HLA Informatics Group による毎年 1 月の報告 (http://hla.alleles.org/alleles/text_index.html) を採用しています。

《性能》

1. 正確性
HLA-DRB1 抗原の遺伝子型が既知である標準検体を用いて、操作手順に従い試験を行うとき、その検体の遺伝子型と一致する判定結果が得られます。
2. 感度
遺伝子型が既知である標準検体(20 ng/µL の染色体 DNA 検体および 200 fg/µL のプラスミド DNA)を用いて、操作手順に従って試験を行うとき、標準検体がプローブに相補的な配列を持つ場合には設定した値以上のシグナル(陽性値)が得られ、相補的な配列を持たない場合には設定した値以下のシグナル(陰性値)が得られます。
3. 同時再現性
正確性試験を 3 回同時に行うとき同一の判定が得られます。